

PĀRTIKAS TOKSIKOINFEKCIJAS IEROSINOŠĀS MIKROFLORAS SASTOPAMĪBA GOVS PIENA IEGUVES UN PIRMĀPSTRĀDES PROCESĀ

INCIDENCE OF FOODBORN TOXICOINFECTIONS SUGGESTIVE MICROFLORA IN MILKING AND FIRST STAGE TREATMENT PROCESSES

Ināra Helēna Konošonoka, Aleksandrs Jemeljanovs, Daina Ikauniece, Gundega Kleina

LLU, Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra”, Latvija
LUA, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigra”, Latvia
sigra@lis.lv

ABSTRACT

Bacterial food poisoning is defined as an illness caused by the consumption of food contaminated with bacteria or bacterial toxins. From dairy farm environment some food born pathogens gain entrance in raw milk. The presence of food born pathogens from *Salmonella* genus, spore forming *Bacillus cereus* and gram-negative *Aeromonas hydrophila* were investigated in the dairy farms environment – feed, manure and water. *Salmonella spp.* was detected only in manure samples. 24.6% of all feed samples were contaminated with vegetative cells, but 18.5% with spores of food born pathogen *Bacillus cereus*. Water used in dairy farms was contaminated with enterotoxins produced bacteria *Proteus vulgaris* (53.3%), *Aeromonas hydrophila* (33.3%) and *Bacillus cereus* (26.7%).

KEY WORDS: foodborn toxicoinfections, pathogens, dairy farm environment.

IEVADS

Pārtikas izraisītās akūtās zarnu infekcijas t.sk. toksikoinfekcijas ir nopietna sabiedrības veselības problēma. Toksikoinfekcijas aizvien vēl ir bieži sastopamas visā pasaulē, katru gadu no tām mirst 1.8 miljoni bērnu (Foodborn Disease Outbreaks). 2009. gada 11 mēnešos (janvāris-novembris) Latvijas infektoloģijas centra stacionārā diagnosticēti 39 uztura toksikoinfekciju gadījumi. Salmoneloze konstatēta 86 gadījumos. 367 gadījumos pacientiem bijusi caureja un gastroenterīts, kuru ierosinātājs nav identificēts, līdz ar to daudzos gadījumos slimības ierosinātājs varēja būt ar mikroorganismiem izdalīts toksīns (Stacionāra darba statistiskie rādītāji). Vairāki autori sniedz atšķirīgas toksikoinfekciju definīcijas. Tā, I.Mazjānis un E.Tirāns (2006) uzskata, ka toksikoinfekcijas ir slimību grupa, kas rodas pēc tādu uzturlīdzekļu lietošanas, kuros mikroorganismu darbības rezultātā ir uzkrājušies entero-, neuro- u.c. toksīni. Veselības enciklopēdijā (2009) toksikoinfekcijas definētas kā akūtas slimības, kas rodas, ja uzturā lieto pārtikas produktus, kuros savairojušies noteikti mikroorganismi un/ vai uzkrājušies to izdalītie toksīni. Kā visbiežāk toksikoinfekcijas izraisošie minēti nosacīti patogēni dabā plaši izplatīti mikroorganismi – *Salmonella enteritidis* u.c. *Salmonella* ģints sugas, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Shigella*(*S.*) *dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, and *S. sonnaei*. A. Brila (2009) pārtikas

toksikoinfekcijas un intoksikācijas iedala slimību grupā, kuras izraisa nosacīti patogēnie mikroorganismi ar pieaugošu patogenitāti, minot *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Erlhia*, *Bacillus*, *Staphylococcus* u.c. ģinšu pārstāvjus.

Piena fermu vide – kūtsmēsli, pakaiši, barības līdzekļi, fermās lietojamais ūdens, govju ķermenis - apmatojums, tesmeņa un pupu āda, pupu slēdzējmuskuļa mikroflora, tesmeņa vai dzemdes iekaisuma sekrēts, slaukšanas iekārtu caurules, piena dzesēšanas un uzglabāšanas tvertnes ir iespējamie toksikoinfekcijas ierosinošo mikroorganismu avoti, no kuriem tie var kontaminēt izslaukto pienu un saglabāties piena produktos, tā apdraudot produktu patērētāju veselību.

Darba mērķis bija noskaidrot toksikoinfekciju ierosinātāju *Salmonella* ģints baktēriju, *B. cereus*, *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) u.c. nosacīti patogēnu toksīnus producējošu baktēriju sastopamību slaucamo govju fermu vidē.

MATERIĀLS UN METODIKA

Kopumā 2008. - 2009. gadā analizēti 175 dzīvnieku barības, fermās lietojamā ūdens un kūtsmēsļu paraugi. Paraugi ņemti četrās saimniecībās: bioloģiskā saimniecībā „Grantskalni”, Pārgaujas novadā, konvencionālajās saimniecībās SIA „Lāčplēša piens”, Lielvārdes novadā, zemnieku saimniecībā „Robežnieki” Salacgrīvas novadā un SIA „Palsa” Smiltenes novadā.

Paraugu bakterioloģiskie izmeklējumi veikti Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskā institūta „Sigra” Latvijas Nacionālā akreditācijas biroja akreditētajā Bioķīmijas un mikrobioloģijas zinātniskajā laboratorijā (LATAK-T-038-07-99-A). *Salmonella* ģints baktērijas izolētas saskaņā ar standarta LVS EN ISO 6579:2003 metodiku; *B. cereus* identificēts saskaņā ar standarta LVS EN ISO 7932:2005 metodiku; *S. aureus* izolēts saskaņā ar standarta LVS EN ISO 6888-1:1999/A1:2003 metodiku; nosacīti patogēnās *A. hydrophila* un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijas tika izolētas, izmantojot kompleksās un selektīvās barotnes: gaļas peptona agaru ar 5% asins piedevu, MacConkey agaru (Biolife, Spānija), RapidEcoli (Biorad, UK) u.c.

Veikta iegūto datu statistiskā apstrāde, izmantojot SPSS 15.0 programmu.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Toksikoinfekciju ierosinātājas baktērijas no *Salmonella* ģints netika konstatētas dzīvnieku barības paraugos (n = 130). *Salmonella enteritidis* konstatējām vienā no pieciem pārbaudītajiem mēsļu paraugiem, līdz ar to mēsli uzskatāmi par vienu no salmonellu avotiem pienā.

Lai gan pārtikas saindēšanos ierosina atsevišķi *B. cereus* celmi, bet citi šīs baktērijas celmi var būt probiotiķi dzīvniekiem, galvenokārt cāļiem, cūkām un trušiem (Ryan, Ray, 2004), tomēr jāņem vērā, ka *B. cereus* producē vemšanu izraisošu toksīnu cereulīdu, kā arī citus piecu veidu toksīnus, līdz ar to ir cilvēku pārtikas toksikožu ierosinātājs. Pēdējos gados pasaulē bijuši 27 000 *B. cereus* ierosināti cilvēku saslimšanas gadījumi (Christiansson et al., 1998; Elnaga et al., 2002). Tā kā *B. cereus* veido sporas, kas iztur augstas temperatūras, tad nereti šo toksikoinfekciju ierosinātāju atklāj sausajā pienā (Snydman, Gorbach, 1991), kur tas nokļūst no fermu vides piena ieguves un pirmapstrādes procesa laikā.

Daļa zinātnieku uzskata, ka dzīvnieku barība ir galvenais faktors *B. cereus* nokļūšanai pienā (Crielly et al., 1994), bet citi norāda, ka dzīvnieku barība ir nozīmīgs faktors piena kontaminēšanai ar *B. cereus* sporām no fekālijām tikai tad, ja sporu skaits ir virs 100 000 vienā gramā fekāliju (Magnusson et al., 2007). Mūsu pētījumā *B. cereus* veģetatīvās šūnas konstatētas 24.6 %, bet sporas – 18.5 % no visiem analizētajiem

barības paraugiem (n = 130). Vērtējot *B. cereus* sastopamību katrā atsevišķā barības līdzekļu grupā (1.tabula), jāsecina, ka tikai 2 zāles paraugi (n = 14) saturēja šīs baktērijas veģetatīvās šūnas, bet sporas zālē netika konstatētas. Savukārt skābbarības (n = 48) un skābsiena (n = 16) paraugi 25.0% gadījumu bija kontaminēti ar *B. cereus* veģetatīvajām šūnām, bet 12.5% gadījumu ar sporām. *B. cereus* veģetatīvo šūnu un sporu klātbūtne skābbarībā liecina par kļūdainu skābbarības sagatavošanas procesu, t.i., nepilnīgu skābbarības noblīvēšanu un skābbarības tvertnes noseģšanu, kā rezultātā gaiss pieklūst skābējamajai masai un ļauj attīstīties, veidot sporas un toksīnus aerobajām *B. cereus* baktērijām.

Sienā (n = 10) *B. cereus* veģetatīvās šūnas konstatētas 20.0% gadījumu, bet sporas netika konstatētas nevienā paraugā. Savukārt visi salmu paraugi (n = 6) bija kontaminēti ar *B. cereus* sporām (1. tabula).

1. tabula / Table 1

***B.cereus* veģetatīvo šūnu un sporu izolēšanas biežums dažādos barības līdzekļos
Incidence of *B.cereus* vegetative cells and spores in different feedstuffs**

Barības līdzekļi Feedstuffs	<i>B. cereus</i> veģetatīvās šūnas Vegetative cells n, (%)	<i>B. cereus</i> sporas Spores n, (%)
Zāle/ Green grass (n = 14)	2 (14.3)	Nav
Skābbarība/ Silage (n = 48)	12 (25.0)	6 (12.5)
Skābsiens/ Haylage (n = 16)	4 (25.0)	2 (12.5)
Siens/ Hay (n = 10)	2(20.0)	Nav
Spēkbarība/ Fodder (n = 32)	10 (31.3)	10 (31.3)
Saimniecībā gatavots barības maisījums/ Self prepared feed concentrate (n = 4)	2 (50.0)	Nav
Salmi/ Straw (n = 6)	2 (33.3)	6 (100.0)

Tā kā salmi tika izmantoti kūtīs kā pakaiši, tad sporas kopā ar putekļiem kontaminē kūts gaisu, sienas, griestus, govju apmatojumu, radot iespēju sporām nokļūt izslauktajā pienā. Zinātnieku pētījumi apliecina, ka vispiesārņotākie ar *B. cereus* ir pakaiši, pie tam *B. cereus* sporu skaits pakaišos pozitīvi korelē ($r = 0.72$) ar sporu skaitu koppienā (Magnusson et.al., 2007). Spēkbarība - dažāda veida graudi, rapša rauši, saulespuķu spraukumi (n = 32) 31.3% gadījumu bija kontaminēti kā ar *B. cereus* veģetatīvajām šūnām, tā sporām. Konvencionālajā saimniecībā gatavotais barības maisījums divos paraugos no četriem bija kontaminēts ar *B. cereus* veģetatīvajām šūnām (1. tabula).

Visbiežāk *B.cereus* veģetatīvās šūnas un sporas konstatējām ziemas periodā lietotajos barības paraugos. Konvencionālajās un bioloģiskajās saimniecībās izolēšanas biežums bija līdzīgs (2. tabula).

Pavasārī *B. cereus* izolēšanas biežums no barības līdzekļiem samazinājās, salīdzinot ar ziemas periodu, abos saimniekošanas veidos. Vasaras periodā vairums analizēto paraugu bija svaiga zāle, tajā *B. cereus* baktērijas konstatējām reti. Iegūtie rezultāti nav pretrunā ar literatūras datiem (Vissers et al., 2007), kur norādīts, ka *B. cereus* sporu pieaugums koppienā vasaras periodā nav saistīts ar govju laišanu ganībās, bet gan ar skābbarības izbarošanu. Rudens periodā, kad dzīvnieku barība ir svaigi sagatavota, kontaminācija ar *B. cereus* bija neliela (2.tabula).

***B. cereus* veģetatīvo šūnu un sporu izolēšanas biežums barības līdzekļos atkarībā no saimniekošanas sistēmas un gadalaika**
Incidence of *B. cereus* vegetative cells and spores depending of management form and season

Sezona/ paraugu skaits Season/number of samples	Bioloģiskā saimniekošana Organic farming		Konvencionālā saimniekošana Conventional farming	
	<i>B. cereus</i> veģetatīvās šūnas/ vegetative cells, %	<i>B. cereus</i> sporas/ Spores, %	<i>B. cereus</i> veģetatīvās šūnas/ vegetative cells, %	<i>B. cereus</i> sporas/ Spores, %
Ziema/ Winter n=48	44.4	44.4	53.3	40.0
Pavasaris/ Spring n=28	27.1	14.3	33.4	15.4
Vasara/ Summer n=20	0.0	0.0	0.0	0.0
Rudens/ Autumn n=34	9.5	14.0	17.6	5.9

Piena fermās ūdens tiek izmantots gan govs tesmeņa apmazgāšanai, gan piena trauku, piena vadu, slaukšanas stobriņu un dzesēšanas tvertņu mazgāšanai. Tādējādi netīrs, ar mikroorganismiem kontaminēts ūdens viegli var piesārņot pienu. Pārbaudot 30 piena fermu ūdensvadu un 10 piena sistēmas skalošanas ūdeņu paraugus, konstatēti vairāki toksikoinfekcijas ierosinoši mikroorganismi (3.tabula).

No ūdens paraugiem izolētā mikroflora un mikroorganismu izolēšanas biežums
Spectrum of microflora and incidence of microorganisms' isolated from water samples

Izolētais mikroorganisms Isolated microorganisms	Paraugšs Sample	
	Piena fermas ūdensvada ūdens Water from water pipe, n = 30; n(%)	Piena dzesēšanas tvertnes skalojamais ūdens Milk cooling tank rinsing water, n = 10; n (%)
<i>Proteus vulgaris</i>	16 (53.3)	10 (100.0)
<i>Enterococcus faecium</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i>	16 (53.3)	10 (100.0)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10 (33.3)	6 (60.0)
<i>Pantoea agglomerans</i>	10 (33.3)	2 (20.0)
<i>B. cereus</i>	8 (26.7)	6 (60.0)
<i>Clostridium spp.</i>	6 (20.0)	4 (40.0)
<i>Leuconostoc citreum</i>	6 (20.0)	6 (60.0)
<i>E. coli</i>	4 (13.4)	4 (40.0)
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	4 (13.3)	6 (60.0)
<i>Aeromonas cavia</i>	2 (6.7)	0

Proteus vulgaris (*P. vulgaris*) satur daudzus virulences faktorus – flagellas, ārējos membrānu proteīnus, lipopolisaharīdus, kapsulu polisaharīdus u.c., t.sk. endotoksīnus (Rozalski et al., 1997). Tādējādi šis mikroorganisms pieskaitāms pie toksikoinfekciju ierosinātājiem. *P. vulgaris* konstatējām 53.3% ūdensvada un visos piena dzesēšanas tvertnes skalojamā ūdens paraugos. *Enterococcus* ģints pārstāvji ir indikatororganismi ūdens piesārņošanai ar fekālijām, līdz ar to fekālijās esošiem patogēniem t.sk. toksikoinfekciju ierosinātājiem no *Salmonella* ģints. *Enterococcus* spp. piesārņojumu uzrādīja 53.3% ūdensvada un 100.0% piena tvertņu skalojamā ūdens paraugi. Ūdens paraugos tika konstatētas divas *Aeromonas* ģints sugas *Aeromonas cavia* un *A. hydrophila*. No sešām *Aeromonas* ģintī esošajām sugām, *A. hydrophila* ir nosacīti patogēna, īpaši izturīga ārējā vidē, aug gan aerobos, gan anaerobos apstākļos, vairojas ledusskapja temperatūrās, ir rezistenta pret dezinfekcijas līdzekļiem. Pateicoties *A. hydrophila* struktūrai, tā ir toksiska dzīvājiem organismiem. Nokļūstot cilvēka vai dzīvnieka organismā, šīs baktērijas kopā ar asins straumi ceļo uz kādu no orgāniem, producējot aerolizīna citotoksisko enterotoksīnu (ACT), kurš bojā organisma audus (Bad Bug Book, 1991). 33.3% ūdensvada ūdens un 60.0% piena tvertņu skalojamā ūdens paraugu konstatētas šīs nevēlamās baktērijas, kas brīvi var kontaminēt izslaukto pienu. Sporas veidojošās baktērijas *B. cereus* saturēja 8 (26.7%) ūdensvada un 6 (60.0%) skalošanas ūdeņu paraugi.

Jāsecina, ka ūdens slaucamo govju fermās ir piesārņots ar mikroorganismiem, t.sk. toksikoinfekciju ierosinātājiem. Ņemot ūdens paraugus fermās, novērots, ka bieži ūdensvada krānam pievienota gumijas caurule, kas izskaidro ievērojamo mikrobiālo piesārņojumu ūdenī. Gumijas caurules un krāna savienojuma vietās, kā arī caurules galā, kas nereti guļ uz grīdas, iespējama mikroorganismu uzkrāšanās un vairošanās, veidojot bioplēves uz šī organiskā materiāla. Šādi mikroorganismi kopā ar ūdeni nonāk slaukšanas sistēmas vados un piena tvertnē, tos mazgājot un skalojot.

Pētījuma rezultāti apliecina, ka slaucamo govju fermu vide – dzīvnieku barība, mēsli un fermās lietojamais ūdens – ir potenciāli toksikoinfekciju ierosinātāju mikroorganismu avoti. Neievērojot sanitāri higiēniskos noteikumus piena ieguves un pirmapstrādes procesu laikā, nevēlamie mikroorganismi var piesārņot iegūto pienu un saglabāties tā pārstrādes produktos.

SECINĀJUMI

1. *Salmonella* ģints baktērijas netika konstatētas dzīvnieku barības paraugos. *Salmonella enteritidis* konstatētas vienā no pieciem kūtsmēslu paraugiem. *Salmonella* ģints baktērijas netika konstatētas ne bioloģiskās, ne konvencionālo saimniecību piena paraugos.
2. Dzīvnieku barība ir riska faktors piena piesārņošanai ar toksikoinfekciju ierosinātāju *B. cereus*. *B. cereus* veģetatīvās šūnas konstatētas 24.6%, bet sporas – 18.5% visu barības paraugu. Skābbarības un skābsiena paraugi 25.0% gadījumos bija kontaminēti ar *B. cereus* veģetatīvajām šūnām. Vispiesārņotākie ar *B. cereus* sporām bija salmu paraugi.
3. Piena fermu ūdensvada ūdens ir piesārņots ar toksikoinfekciju ierosinātājiem mikroorganismiem: *P. vulgaris* konstatēts 53.3%, *A. hydrophila* – 33.3% un *B. cereus* – 26.7% ūdens paraugu. Piena dzesēšanas tvertnes skalošanas ūdenī minēto mikroorganismu izolēšanas biežums pieaug, atbilstoši, 100.0%, 60.0% un 60.0%.

LITERATŪRA

1. Bad Bug Book (1991) Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. "[Aeromonas hydrophila.](#)" [Elektroniskais resurss]. – Tiešsaistes pakalpojums. – Pieejas veids: tīmeklis <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/appl-Resurss> aprakstīts 2010.30.04.
2. Brila, A. Infekcijas slimību epidemioloģija.- Rīga: Nacionālais apgāds, 2009; 198. ISBN 978-9984-26-409-7.
3. Crielly, E.M., Logan, N.A., Anderton, A. Studies on the Bacillus flora of milk and milk products. - Journal of Applied Microbiology. 1994; 77: 256-263.
4. Elnaga, H.I., Hegazi, F.Z., Elnaga, I.G. Spore-forming rods surviving boiling the raw milk and implicated in later spoilage of the product // Archiv fur Lebensmittelhygiene 2002; Vol.53, no 4: 86-89.
5. Foodborn Disease Outbreaks: Guidelines for Investigations and Control. World Health Organization, 200; 146. ISBN 978-92-4-1547222.
6. Konošonoka, I. H., Jemeljanovs, A., Blūzmanis, J. Staphylococcus ģints baktēriju sastopamība veselu govju pienā un slimu govju tesmeņa sekretā. Zinātniskā konferences “Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas kvalitāte” rakstu krājums, Jelgava, Veterinārmedicīnas fakultāte. 2004; 150. – 155.
7. Magnusson, M., Christiansson, A., Svensson, B. Bacillus cereus Spores During Housing of Dairy Cows: Factors Affecting Contamination of Raw Milk. – Journal of Dairy Science. 2007; 6: 2745-2754.
8. Mazjānis, I., Tirāns, E. Infekcijas slimības // Mikrobu ierosinātās saindēšanās ar uzturlīdzekļiem –Rīga, 2006; 501-515. ISBN 9984-9236-5-7.
9. Ryan, KJ; Ray, CG. Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. 2004; 979.
10. Rozalski, A., Sidorczyk, Z., Kotelko, K. Potential virulences factors of Proteus bacilli. – Microbial Mol Biol Rev.. 1997; 61 (1): 65-89.
11. Snyderman, D.R., Gorbach, S.L. Bacterial food poisoning // Bacterial infections of humans. Epidemiology and control. USA, 1991; 87-113.
12. Stacionāra darba statistiskie rādītāji (pacientu skaits diagnožu grupās). 2009.gada janvāris- novembris. Latvijas infektoloģijas centrs. [Elektroniskais resurss]. – Tiešsaistes pakalpojums. – Pieejas veids: tīmeklis <http://www.lic.gov.lv/docs/268/2009-dok/Stac-atsk.pdf>
13. Veselības enciklopēdija. Uztura toksikoinfekcijas.- Rīga: Nacionālais apgāds, 2009; 649-650.
14. Vissers, M.M.M., Te Giffel, M.C., Driehuis, F., De Jong, P., Lankveld, J.M.G. Minimizing the Level of Bacillus cereus Spores in Farm Tank Milk. – Journal of Dairy Science. 2007; 90,7: 3286-3293.